

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 19, №3

2020



УДК 615.246.2

14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.29

СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ И ШИШЕК СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© Гуляев Д.К., Суменкова А.М., Белоногова В.Д., Рудакова И.П., Курицын А.В.

*Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2**Резюме*

Цель. Исследование состава и сорбционной активности полисахаридов древесной зелени и шишек сосны обыкновенной.

Методика. Для исследования были собраны образцы древесной зелени и шишек сосны обыкновенной в августе 2018 г. в сосновом лесу на лесосеке. Состав полисахаридов определяли с помощью восходящей хроматографии на бумаге. Острую токсичность полисахаридов определяли по методике Прозоровского В.В. Сорбционную активность по способности связывать метиленовый синий в мг/г.

Результаты. Установлено, что молекулы полисахаридов древесной зелени и пектиновых веществ шишек построены из арабинозы, галактозы, галактуроновой кислоты, а водорастворимый полисахаридный комплекс шишек состоит из арабинозы и галактуроновой кислоты. По результатам определения острой токсичности все исследованные вещества отнесены к классу малотоксичных веществ с $LD_{50} > 5000$ мг/кг. Сорбционная активность оказалась наибольшей у водорастворимого полисахаридного комплекса шишек сосны около $309,78 \pm 0,45$ мг/г, что превышает активность препаратов сравнения угля активированного и диоксида кремния коллоидного (Полисorb). Полисахариды древесной зелени сосны оказались менее активными.

Заключение. Водорастворимый полисахаридный комплекс шишек сосны проявляет выраженную сорбционную активность и является перспективным для дальнейших исследований с целью разработки препаратов сорбентов.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, древесная зелень, шишки, полисахариды, острая токсичность, сорбционная активность

THE SORPTION ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES OF PINE CONES AND WOODY GREENS

Gulyaev D.K., Sumenkova A.M., Belonogova V.D., Rudakova I.P., Kuritsyn A.V.

*Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaja St., 614990, Perm, Russia**Abstract*

Objective. Research of the composition and sorption activity of polysaccharides of pine cones and woody greens.

Methods. The samples of pine cones and woody greens were collected on a pine forest cutting area in August 2018. The polysaccharides composition was determined by the ascending paper chromatography. The polysaccharides acute toxicity was determined by the method of V. Prozorovsky. Sorption activity was determined by the ability to bind methylene blue in mg/g.

Results. It was found that the polysaccharide molecules of pine cone and woody greens pectin substances are constructed of arabinose, galactose, galacturonic acid, and the cones water-soluble polysaccharide complex consists of arabinose and galacturonic acid. According to the results of acute toxicity determination, all the studied substances are related to the class of low toxic substances with $LD_{50} > 5000$ mg/kg. The water-soluble polysaccharide complex of pine cones shows the highest level of sorption activity – about 309.78 ± 0.45 mg/g, which exceeds the activity of standard medication: absorbent carbon and colloidal silicon dioxide (Polysorb). Pine woody greens polysaccharides were less active.

Conclusion. The water-soluble polysaccharide complex of pine cones exhibits the strong sorption activity and is budding for further research with the purpose of absorbent medications development.

Keywords: pine, woody greens, cones, polysaccharides, acute toxicity, sorption activity

Введение

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – является одной из главных лесообразующих пород на территории Российской Федерации. Древесина сосны является ценным сырьем для строительства и деревообрабатывающих предприятий. При заготовке древесины на лесосеках остаются древесная зелень и шишки, которые являются источником биологически активных веществ.

Химический состав и фармакологическая активность шишек и хвои различных видов сосны были исследованы многими российскими и зарубежными учеными. Так, у экстракта шишек *Pinus yunnanensis*, китайскими учеными установлена высокая противовирусная активность. Экстракт шишек *Pinus yunnanensis* ингибировал острую репликацию ВИЧ, а также значительно ингибировал цитолиз, индуцированный ВИЧ, в клетках [10].

Корейские ученые установили, что метанольный экстракт шишек *Pinus densiflora* проявлял выраженную антиоксидантную активность, снижал активность свободных радикалов DPPH ($IC_{50} = 9,57 \pm 1,24$ мкг / мл) [7]. У спиртовых и водно-спиртовых экстрактов хвои выявлена выраженная антиоксидантная активность, а также способность к активации макрофагов [9].

Помимо эфирного масла, хлорофиллов, пигментов, древесная зелень и шишки хвойных деревьев богаты полисахаридами. Ранее нами в исследованиях древесной зелени и шишек ели обыкновенной показана высокая фармакологическая активность полисахаридного комплекса [1]. Учитывая близость двух видов семейства сосновых, полисахариды древесной зелени и шишек сосны обыкновенной являются интересным объектом для исследований.

Одним из основных условий положительного исхода заболевания является своевременное выведение из организма токсических веществ, балластных веществ экзо- и эндогенной природы. Образующиеся в желудочно-кишечном тракте эндотоксины вызывают деструкцию молекул белков и липидов клеток организма, блокируют синтетические и окислительные процессы. Для удаления экзо – и эндотоксинов используют различные технологии сорбции токсичных веществ: гемо-, плазмо-, ликворосорбция, энтеросорбция, вальнесорбция, иммуносорбция, аппликационная сорбция [6]. Растительные полисахариды рассматриваются не только в качестве эффективных сорбентов, а также в качестве пребиотиков, веществ, которые стимулируют рост полезной микрофлоры кишечника и ограничивают размножение патогенных бактерий, что является преимуществом перед другими видами сорбентов.

Целью работы является исследование состава и сорбционной активности полисахаридов древесной зелени и шишек сосны обыкновенной.

Методика

Сырьем для получения полисахаридных фракций являлись древесная зелень и шишки сосны обыкновенной. Сбор образцов сырья проводили на территории Ильинского района Пермского края в сосновом лесу, в августе 2018 г. Древесную зелень и шишки собирали, и высушивали воздушно-теньевым способом. Полисахаридные фракции выделяли по методу Н.К. Кочеткова, адаптированном к исследуемому сырью [3]. Навеску воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц диаметром 2 мм. Экстрагировали водой очищенной в соотношении 1:20 при температуре 80°C в течение 90 минут. Извлечение упаривали под вакуумом, и осаждали водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПК) добавлением трехкратного количества спирта этилового 9%.

Шрот после выделения водорастворимого полисахаридного комплекса экстрагировали смесью раствора аммония оксалата 0,25% и раствора щавелевой кислоты 0,25% (1:1), при гидромодуле 1:10, в течение 1,5 ч. Извлечения упаривали под вакуумом, и осаждали пектины (ПВ) добавлением четырехкратного количества спирта этилового 95%. Полученные фракции очищали многократным промыванием спиртом 80%.

Для определения моносахаридного состава, выделенных фракций, проводили их кислотный гидролиз раствором серной кислоты 1% при нагревании в течение 10 ч. Моносахаридный состав гидролизатов определяли с помощью восходящей хроматографии на бумаге в системе растворителей: бутанол-пиридин-вода (6:4:3). Хроматограммы обрабатывали анилинфталатным реактивом, проявляли в сушильном шкафу при температуре 100-105°C до появления окраски.

Для исследования использовали экспресс метод определения средней летальной дозы по Прозоровскому В.В [4]. Вещества вводили однократно в дозах от 1000 до 5000 мг/кг, перорально с помощью желудочного зонда. После введения экстракта оценивали состояние животных

непрерывно в течение 6 ч. Отмечали отсутствие или наличие случаев летальности животных. По результатам эксперимента вещества относили к классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007-7.

Определение влажности проводили на анализаторе влажности AND ML-50 (Япония), температура высушивания 105°C, порог срабатывания 0,1%, навеска 5,0 г.

Результаты определений на анализаторе влажности сопоставимы с результатами определения по методике Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV, ОФС.1.5.3.0007.15. «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Определение содержания свободных и этерифицированных карбоксильных групп проводили по методике [2]. К навеске полисахаридов около 1,0 г (точная навеска), смоченных спиртом для предотвращения комкования, при перемешивании добавляли 100 мл воды, нагретой до 40°C для лучшего растворения. Навеску полисахаридов растворяли в течение 2-х ч. при периодическом перемешивании, и титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида до слабо-розовой окраски, не исчезающей, в течение 30 с, индикатор – фенолфталеин. Содержание свободных карбоксильных групп ($K_{св}$) находили по формуле:

$$K_{св} = \frac{V_{NaOH}}{a \times (1 - 0,01 \times w)} \cdot 0,45\%,$$

где V_{NaOH} – количество 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование, в мл, 1 мл натрия гидроксида соответствует 0,0045 г карбоксильных групп, a – навеска полисахаридов, г.

К нейтрализованной пробе при определении свободных карбоксильных групп, добавляли 50 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида для омыления метоксилированных карбоксильных групп. Колбу оставляли на 2 ч. в темноте при комнатной температуре. После омыления метоксилированных карбоксильных групп, в колбу добавляли 50 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной, её избыток оттитровывали 0,1 М раствором натрия гидроксида. Количество этерифицированных карбоксильных групп ($K_{эт}$) определяли по формуле:

$$K_{эт} = \frac{V_{NaOH}}{a \times (1 - 0,01 \times w)} \cdot 0,45\%,$$

где V_{NaOH} – объём 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедший на второе титрование, мл, a – навеска полисахаридов, г.

Общее количество карбоксильных групп находили путём суммирования количества свободных и этерифицированных групп:

$$K_{общ} = K_{св} + K_{эт}, \%$$

Степень этерификации (СЭ) определяли, как отношение содержания этерифицированных групп к общему содержанию карбоксильных групп:

$$СЭ = \frac{K_{эт}}{K_{общ}} \cdot 100\%$$

Определение сорбционной активности проводили по методике Решетникова В.И. [5]: около 0,2 г полисахаридов (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл 0,15% раствора метиленового синего, и перемешивали на лабораторном шейкере с числом колебаний 140/мин в течение 1 ч. Отделение равновесного раствора после сорбции проводили путем центрифугирования при 8000 оборотов в минуту. Один миллилитр надосадочной жидкости переносили в мерную колбу объемом 500 мл, и доводили до метки водой очищенной. Далее измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ 2000 при 664 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную. Расчет показателя сорбционной активности проводили по общепринятой формуле:

$$X = \frac{(A_0 - A) \times a \times 50}{A_0 \times b \times (1 - 0,01 \times W)},$$

где A_0 – оптическая плотность раствора РСО метиленового синего; A – оптическая плотность испытуемого раствора; a – фактическая концентрация раствора РСО метиленового синего мг/мл; b – навеска вещества в граммах; 50 – объём раствора РСО альбумина, мл; W – влажность вещества в процентах.

Результаты исследования и их обсуждение

Первым этапом исследования было установление состава полисахаридов древесной зелени и шишек сосны обыкновенной с помощью хроматографии на бумаге (рис.).

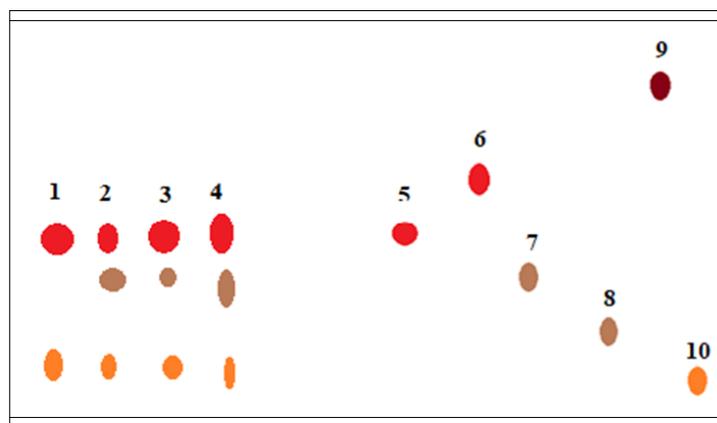


Рис. Хроматограмма гидролизатов полисахаридов древесной зелени и шишек сосны. 1 – ВРПК шишек сосны; 2 – ПВ шишек сосны; 3 – ВРПК древесной зелени сосны; 4 – ПВ-древесной зелени сосны; 5 – арабиноза; 6 – ксилоза; 7 – галактоза; 8 – глюкоза; 9 – рамноза; 10 – галактуроновая кислота

На хроматограмме видно, что всех исследуемых полисахаридов, за исключением водорастворимого полисахаридного комплекса шишек сосны, после обработки анилинфталатным реактивом и выдерживании в сушильном шкафу при температуре 105°C, характерно появление пятен, которые соответствуют значениям Rf арабинозы (0,43), галактозы (Rf 0,33) и галактуроновой кислоты (Rf 0,1). В водорастворимом полисахаридном комплексе шишек сосны обнаружены только арабиноза и галактуроновая кислота.

Для дальнейшего изучения полученных полисахаридных фракций древесной зелени и шишек сосны обыкновенной необходимо было исследовать их острую токсичность, чтобы удостовериться в безопасности полученных веществ. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Исследование острой токсичности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек сосны обыкновенной

№	Вещество	ЛД ₅₀ мг/кг
1	ВРПК древесной зелени	>5000
2	ВРПК шишек	>5000
3	ПВ древесной зелени	>5000
4	ПВ шишек	>5000
5	ВРПК древесной зелени (из водного остатка после отгонки эфирного масла)	>5000
6	ВРПК шишек (из водного остатка после отгонки эфирного масла)	>5000

В результате введения разных доз полисахаридных фракций мышам, случаев гибели не было обнаружено. Острую токсичность установили по максимально введенной дозе более ЛД₅₀>5000 мг/кг. В ходе эксперимента установлено, что исследуемые вещества можно отнести к 4 классу малоопасных веществ согласно ГОСТ 12.1.007-76.

Представляло интерес определить содержание свободных и этерифицированных карбоксильных групп, для установления влияния на выраженность проявления сорбционной активности (табл. 2).

Таблица 2. Характеристики полисахаридных фракций

№	Вещество	Влажность, %	Свободные карбоксильные группы, %	Этерифицированные группы, %	Степень этерификации, %
1	ВРПК древесной зелени	8,8	2,94	2,89	49,57
2	ВРПК шишек	11,5	3,73	1,69	31,18
3	ПВ древесной зелени	9	4,82	5,96	55,29
4	ПВ шишек	9,3	8,78	10,03	53,32

Пектиновые вещества древесной зелени и шишек сосны обыкновенной содержат большее количество карбоксильных групп, но при этом содержание этерифицированных групп и степень этерификации выше.

Наличие сложноэфирных связей в полимерных звеньях полисахарида снижает способность связывать токсические вещества. Степень этерификации молекулы полисахарида связана с его сорбционной и комплексообразующей способностью [8]. Водорастворимый полисахаридный комплекс древесной зелени и шишек сосны содержит меньшее количество карбоксильных групп по сравнению с пектиновыми веществами, но при этом, содержание этерифицированных групп и степень этерификации ниже, что указывает на возможность проявления сорбционной активности.

На сорбционные свойства полисахаридов оказывает влияние и содержание влаги. Сорбционная активность некоторых веществ повышается в увлажненном состоянии или наоборот в абсолютно сухом [9].

Полисахаридные фракции древесной зелени и шишек сосны обыкновенной исследовали на наличие сорбционной активности, которую оценивали по способности полисахаридных фракций поглощать метиленовый синий. Метиленовый синий является маркером для большинства медицинских сорбентов (угли активированные, лигнины, углерод-минеральные сорбенты и др.), при концентрации 0,15% в 50 мл на 0,15-0,2 г сорбента. Данный краситель моделирует класс токсинов с молекулярной массой до 500 а.е.м (креатин, мочева кислота, барбитураты и др.). В качестве препаратов сравнения выступали наиболее популярные на сегодняшний день сорбенты уголь активированный и диоксид кремния коллоидный (Полисорб). Результаты определения сорбционной активности представлены в табл. 3.

Таблица 3. Сорбционная активность полисахаридов древесной зелени и шишек сосны обыкновенной

№	Вещество	Сорбционная активность, мг/г
1	ВРПК древесной зелени	191,95±0,98
2	ВРПК шишек	309,78±0,45*
3	ПВ древесной зелени	86,87±2,24
4	ПВ шишек	93,55±2,87
5	Уголь активированный	230,9±2,34
6	Диоксид кремния коллоидный (Полисорб)	211,5±1,87

Примечание: * – Статистически значимое различие с активностью угля активированного (p<0,05)

По результатам исследования (табл. 3) установлено, что наибольшей сорбционной активностью обладает водорастворимый полисахаридный комплекс шишек сосны. Его активность оказалась выше, чем у препаратов сравнения, угля активированного и диоксида кремния (Полисорб). Водорастворимый полисахаридный комплекс древесной зелени сосны обыкновенной, так же обладает сорбционной активностью, которая уступает по степени выраженности препаратам сравнения.

Сорбционная активность исследуемых веществ, связана со степенью этерификации карбоксильных групп. Чем больше карбоксильных групп метоксилированы, тем выше степень этерификации полисахарида. Водорастворимый полисахаридный комплекс шишек сосны имеет степень этерификации ниже, чем у других исследуемых веществ, что может объяснить его высокую сорбционную активность. То же наблюдается и в свойствах полисахаридов древесной зелени, где при разной степени этерификации водорастворимого полисахаридного комплекса и пектиновых веществ, различается и их сорбционная активность.

Заключение

Установлен состав полисахаридного комплекса древесной зелени и шишек сосны обыкновенной. Водорастворимый полисахаридный комплекс и пектиновые вещества древесной зелени, а также пектиновые вещества шишек состоят из арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты. Водорастворимый полисахаридный комплекс шишек состоит только из галактуроновой кислоты и арабинозы. Полученные полисахариды можно отнести к классу малотоксичных веществ с ЛД₅₀>5000 мг/кг.

Установлено, что наибольшей сорбционной активностью обладает водорастворимый полисахаридный комплекс шишек сосны 309,78±0,45 мг/г сорбции метиленового синего, что

превышает активность препаратов сравнения угля активированного ($230,9 \pm 2,34$ мг/г) и диоксида кремния коллоидного ($211,5 \pm 1,87$ мг/г). Таким образом, водорастворимый полисахаридный комплекс шишек сосны является перспективным для дальнейших исследований.

Литература (references)

1. Гуляев Д.К., Белоногова В.Д., Рудакова И.П. Водорастворимые полисахариды корней ели сибирской / Фармация. – 2017. – №7. – С. 39-42. [Gulyayev D.K., Belonogova V.D., Rudakova I.P. / *Farmatsiya. Pharmacy*. – 2017. – N7. – P. 39-42. (in Russian)]
2. Донченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов: учебное пособие. – М.: ДеЛи, 2000. – 255 с. [Donchenko L.V. *Tekhnologiya pektina i pektinoproductov: uchebnoye posobiye*. Technology of pectin and pectin products: a training manual – M.: DeLi, 2000. – 255 s. (in Russian)]
3. Кочетков Н.К. Химия углеводов. – М.: Химия, 1967. – 672 с. [Kochetkov N.K. *Khimiya uglevodov*. Carbohydrate chemistry. – M.: Chemistry, 1967. – 672 s. (in Russian)]
4. Прозоровский В.В., Прозоровская В.М. Экспресс метод определения средней летальной дозы // Фармакология и токсикология. – 1978. – №4. – С. 497-502. [Prozorovskiy V.V., Prozorovskaya V.M. *Farmakologiya i toksikologiya*. Pharmacology and Toxicology. – 1978. – N4. – P. 497-502. (in Russian)]
5. Решетников В.И. Принципы разработки лекарственных форм сорбентов. - Пермь: ГОУ ВПО ПГФА Росздрава, 2008. – 196 с. [Reshetnikov V.I. *Printsipy razrabotki lekarstvennykh form sorbentov*. Principles for the development of dosage forms of sorbents. – Perm': GOU VPO PGFA Roszdrava, 2008.-196 s. (in Russian)]
6. Симбирцев С. А., Беляков Н. А. Патофизиологические аспекты эндогенной интоксикации // Эндогенные интоксикации: Сборник тезисов международного симпозиума. – СПб, 1994. – С. 5-9. [Simbirtsev S. A., Belyakov N. A. Endogennyye intoksikatsii: Sbornik tezisov mezhdunarodnogo simpoziuma. Endogenous intoxication: Abstracts of the international symposium. – Spb, 1994. – S. 5-9. (in Russian)]
7. Ah Reum L., Seong-Soo R., Eun-Sook L., Yu-Hong M. Anti-oxidant and Anti-melanogenic Activity of the Methanol Extract of Pine Cone // *Asian Journal Beauty Cosmetology*. – 2016. – N14. – P. 301-308; DOI: 10.20402/ajbc.2016.0055.
8. Mata Y.N., Blazquez M.L., Ballester A., Gonzalez F., Munoz J.A. Sugar-beet pulp pectin gels as biosorbent for heavy metals: Preparation and determination of biosorption and desorption characteristics // *Chemical Engineering Journal*. – 2009. – V.150. – P. 289-301; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2009.01.001>.
9. Nam-Young Kim, Min-Kyung Jang, Dong-Geun Lee et al. Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts // *Nutrition research and practice*. – 2010. – N4. – P. 16-22. DOI: 10.4162/nrp.2010.4.1.16.
10. Xuan Zhang, Liu-Meng Yang, Guang-Ming Liu et al. Potent Anti-HIV Activities and Mechanisms of Action of a Pine Cone Extract from *Pinus yunnanensis*. // *Molecules*. – 2012. – 17. – P. 6916-6929; doi:10.3390/molecules17066916.

Информация об авторах

Гуляев Дмитрий Константинович – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: profmol17@gmail.com

Суменкова Анна Михайловна – аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: agafonova.anna-pharm@yandex.ru

Белоногова Валентина Дмитриевна – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: belonogovavd@yandex.ru

Рудакова Ирина Павловна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: rudakova.i@list.ru

Курицын Алексей Васильевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: kuritsyn1981@pfa.ru